

牛体外受精技術を利用した 肉用牛生産の循環システムの確立

体外受精卵利用システム開発研究チーム（代表：神部正路¹）

体外受精卵生産グループ（神部正路¹）

流通グループ（森 治良²、寺内正光³）

生産者グループ（海老澤 清⁴）

現所属先：¹（社）家畜改良事業団 家畜バイテクセンター

²神戸中央畜産荷受（株）・³東京食肉市場（株）・⁴（財）興農会

1 技術開発の背景と目的

体外受精技術は哺乳動物の精子と卵子を試験管の中で受精させることで、ヒトの「試験管ベビー」として良く知られている。

一方、牛では人工授精の広範な普及から体外受精に実用的価値を見いだすことが難しいと考えられていた。ところが、1986年に牛卵巣から採取した卵子の体外成熟・体外受精による最初の産子が作出された後、それまで廃棄されていた卵巣が個体を生産し得る資源として認識されるようになった。その後、牛卵子の体外受精は子牛生産のための新技術と位置付けられて研究開発が進み、今日では新たな繁殖技術として実用域に達している。

（社）家畜改良事業団では、昭和62～63年に群馬県内で、平成元年度には千葉および熊本県内で大規模な試験移植を行い、その成果を確認した後、平成3年度から国の生産振興策の一環として全国を対象に黒毛和種体外受精卵を利用した子牛生産事業に着手した。この事業は、牛肉輸入自由化に対応して国内農家の国際競争力を高める意向が込められており、黒毛和種の増産を目指した展開が図られた。

生産した受精卵を凍結保存して全国に流通したものの、試験結果とは異なり受胎率の低迷などを招いたことから、受胎率の向上につながる方法を模索した。その試験時に、受精卵を吸引したストローを温湯の入ったポットの中に入れて遠隔地へ輸送する方法も採用していたことを回顧し、適切な機能をもった輸送器があれば、毎日作出される体外受精卵をストローに詰めて全国に流通することが可能となることから、凍結保存を行わないで流通させる方式の開発を目指した。

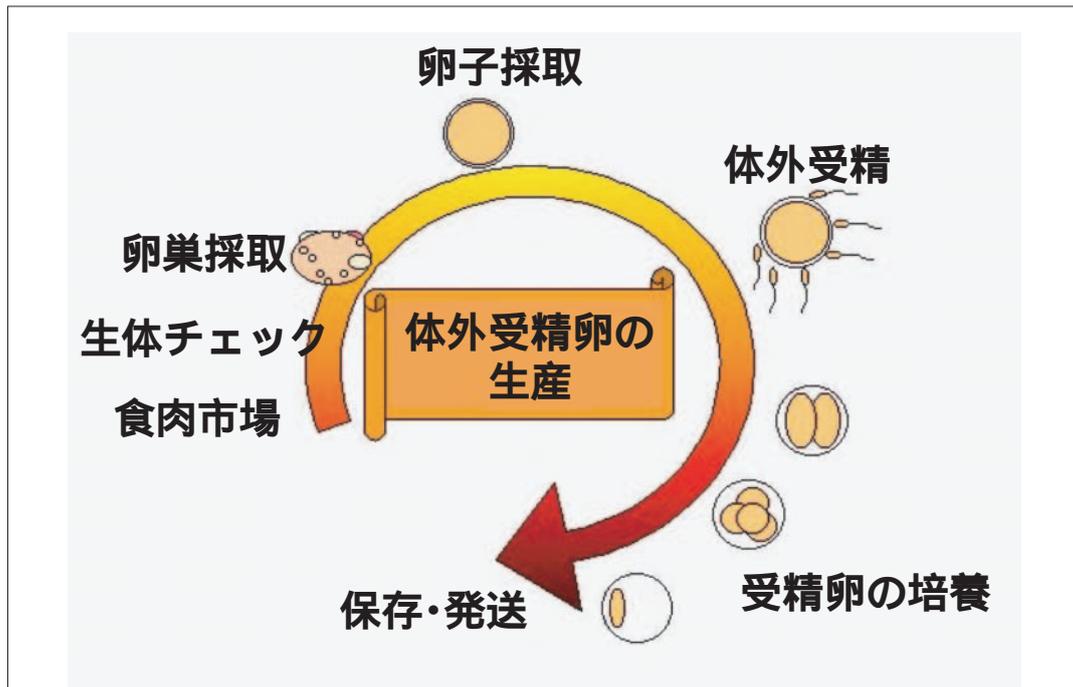


図1 体外受精卵の生産のしくみ

2 技術開発の概要

1) 輸送器具の開発

輸送器を開発するに当たり、本体のコンセプトを以下の5項目とした。

38 の温度維持が24時間以上可能な小型バッテリーを内蔵している。

ストローのエアカラムが動かないような振動を吸収する容器である。

配便等で輸送可能な大きさである。

メンテナンスが簡便である。

購入価格が適切である。

輸送器のサイズと重量は、輸送にかかる費用に反映する。そこで、本体は、縦22cm、横27cm、高さ20cmのポリビニル製の箱を利用することとし、底部にバッテリーを横置きし、その上部に温度調整のための操作パネルとストローの保管部位を置く設計とした。輸送器は、宅配便あるいは航空貨物で発送することが前提条件であることから、閉鎖式の小型バッテリーで、かつ充電後24時間以上は電気の供給が可能な種類を選定した(写真1、2)。



写真1 輸送器外観



写真2 バッテリー内蔵

受精卵を封入したストローは、加温装置を備えた金属板で挟み込み、温度を一定に維持する形式を採用し、金属板には溝を彫ってストローの保定を図った。また、上蓋の一部ははずすとストローに印字した番号が読み取れ、受精卵を吸入した部位が直接外気に接しない構造を採用した（写真3）。

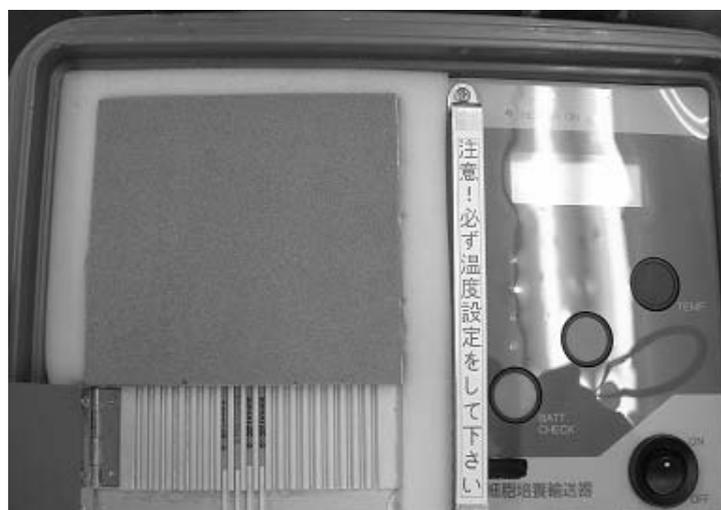


写真3 輸送器内部

これらの条件を満たした試作器を38℃に設定し、培養液を詰めたストローに温度センサーを挿入し、40℃および30～35℃の温度環境下に静置してストロー内の温度の変化を検査した結果、ストロー内は38±0.2℃の温度で安定した。しかし、40℃に設定した環境内ではストロー内温度が40.2℃まで温度が上昇することが明らかになった。輸送器に冷却能力を付加することは、コンプレッサーの追加や廃熱処理等の問題が新たに発生し、簡易輸送器としては構造上不可能であった。夏場の輸送では、宅配便等のトラックの荷室が38℃以上になることを想定し、輸送箱と輸送器の間に保冷剤を敷き詰める等の対応により対処することとした。

また、試作器に受精卵を入れた場合と同様のカラムを作ったストローを設置し、輸送器を段ボール箱に入れて東京から群馬県へは宅配便で、北海道へは航空貨物での反復輸送を試みた結果、ストロー内のカラム構成（空気層の位置）が壊れる結果となった。そこで、専用の外箱を作成し、箱の内側に厚さ5cmの発泡ウレタンを敷いて衝撃を吸収する構造とし、これらの問題を回避した。

新鮮卵輸送が実際に利用され始めてしばらく経過した後、移植現地からストローが溶けているという連絡があった。輸送器を検証したところ、携帯電話等による電波障害により設定温度が変わってしまったことが明らかになった。そこで、それまで利用していたポリビニル製の容器をジュラルミン容器に変え、さらに外箱もジュラルミン容器として2重の防止策を整え、特殊な計測により電波障害を受けないことを確認した上で、輸送器を用いた新鮮卵の流通を再開して現在に至っている。

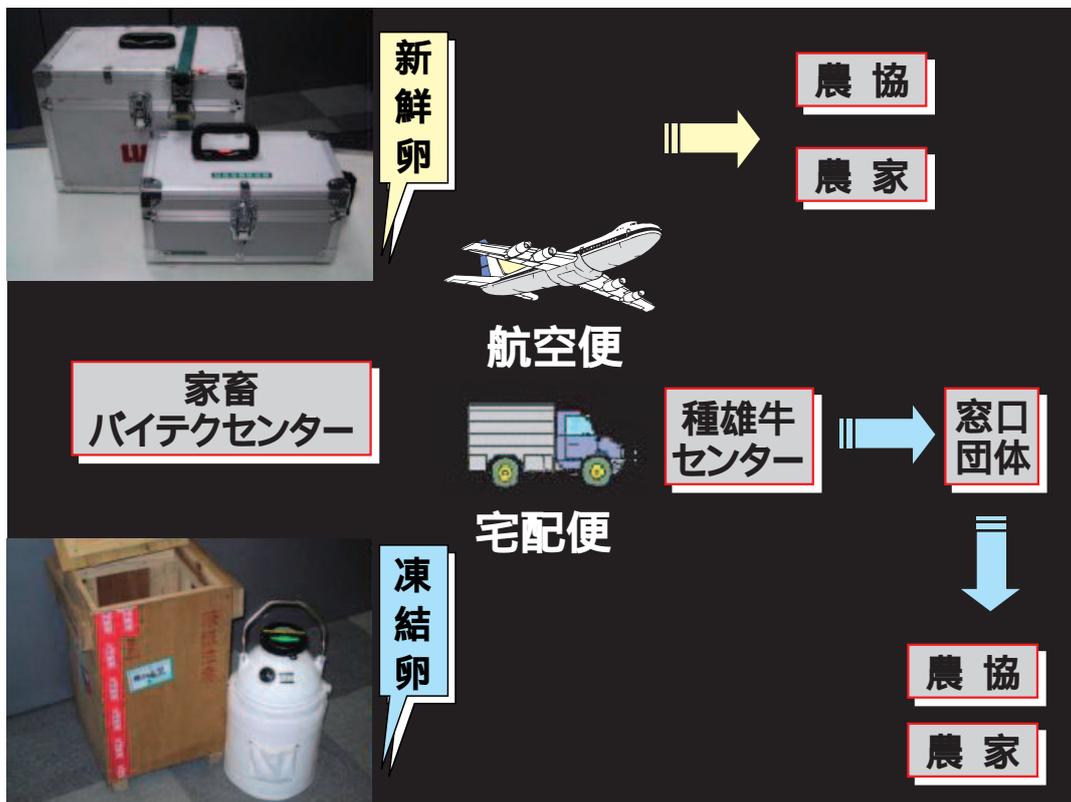


図2 体外受精卵の輸送の流れ

2) 培養液の開発

新鮮卵の輸送には、空気中でもpHの変動がないように調整した修正TCM199培地（m-199）に20%子牛血清を添加して用いてきた。しかし、輸送後のおよそ20%の受精卵が何らかのダメージを受け、移植に適さないと判断されていた。そこで、受精卵の品質が低下しないような新鮮卵専用の培養液の開発に着手した。

受精卵の培養には使われたことのない抗酸化物質を培地に添加すると、受精卵の発生が促されたことに着目し、m-199+20%子牛血清添加培地にメルカプトエタノール（ME）を添加して受精卵の生存性におよぼす効果を観察した。

種々の濃度でMEを添加したTCM199+20%子牛血清中に受精卵を導入し、炭酸ガス培養器内で24時間の培養を行い、その生存性ならびにランクを観察した。その結果、生存性はME無添加と50~150 μ M添加区の間で有意差が認められた。一方、

ME添加濃度が高くなるに従い最優良（excellent）および優良（good）ランクの割合は有意に増加し、200 μ Mでは逆に減少することが明らかになった（表1）。

種々の濃度でMEを添加したm199+20%子牛血清と受精卵を0.25mlストロー中に吸引して封入し、細胞培養輸送器を用いて東京-北海道間を輸送して、その生存性ならびにランクを観察した。その結果、ME無添加区での生存性は添加区に比べ有意に低く、さらに100および150 μ Mでは全てがexcellentおよびgoodランクであった（表2）。

これらの結果から、抗酸化物質であるMEの添加により、受精卵を輸送した後の生存性ならびにランクの維持が確認された。

表1 種々の濃度のメルカプトエタノール添加培地中で体外培養した胚盤胞の生存性とランク¹⁾

β ME 添加濃度 (μ M)	培養胚盤胞数	胚盤胞生存数 (%)	胚盤胞のランク (%)
0	30	25 (83.3) ^a	15 (50.0) ^a
10	30	26 (86.7) ^a	19 (63.3) ^a
50	30	30 (100) ^b	24 (80.0)
100	30	30 (100) ^b	30 (100)
150	30	30 (100) ^b	30 (100)
200	29	29 (100) ^b	25 (86.2)

注1) ランク：最優良（excellent）および優良（good）ランク

表2 種々の濃度のメルカプトエタノール添加培地で輸送した胚盤胞の生存性とランク¹⁾

βME 添加濃度 (μ M)	培養胚盤胞数	胚盤胞生存数 (%)	胚盤胞のランク数 (%)
0	40	28 (70.0) ^a	15 (37.5) ^a
10	40	40 (100) ^b	32 (80.0) ^b
50	40	40 (100) ^b	35 (87.5) ^b
100	43	43 (100) ^b	43 (100) ^c
150	39	39 (100) ^b	39 (100) ^c

注1) ランク：最優良 (excellent) および優良 (good) ランク

3 開発技術の普及

1) 体外受精卵の生産

東京都中央卸売市場食肉市場および神戸市中央卸売市場西部市場の協力により、出荷された黒毛和種牛の卵巣を材料として採取している。注射針を接続した注射筒を用いて卵巣から卵子を吸引採取後、実体顕微鏡下で形態を観察しながら選別し、TCM199 + 5%牛胎児血清培地中で21時間の成熟培養を行う。

体外受精には、(社)家畜改良事業団の検定済種雄牛の凍結精液を用い、成熟培養を終了した卵子と洗浄した精子を5～6時間一緒に培養して受精を促す。

体外受精日を0日とし、7～8日まで卵子周囲に付着していた卵丘細胞とともに培養を行い、体外で移植可能な受精卵を生産する。発生した受精卵は形態学的に観察し、最優良 (excellent) と判定した受精卵のみを移植に供する。

2) 体外受精卵の流通

受精卵は、凍結保存卵と新鮮卵の2つの形態により全国に流通している。ここ5年間の利用率は、表3に示す通りである。

表3 体外受精卵の流通形態別利用率の推移

年度	流通合計数	新鮮卵 ¹⁾ (%)	凍結卵 ²⁾ (%)
11	8,436	3,687 (43.7)	4,749 (56.3)
12	11,381	4,858 (42.7)	6,523 (57.3)
13	9,059	3,831 (42.3)	5,228 (57.7)
14	9,334	4,337 (46.5)	4,997 (53.5)
15	11,932	4,892 (41.0)	7,040 (59.0)

注1) 新鮮卵：輸送培地と受精卵を吸引・封入した0.25mlストローを細胞培養輸送器にセットし、宅配便や航空貨物等を使い24時間以内に移植現地に直接輸送する。

注2) 凍結卵：凍結保護物質にグリセロールを利用したダイレクト法を採用、凍結保存した受精卵は、液体窒素中に浸漬された状態で移植現地へ輸送する。

3) 体外受精卵の受胎性

体外受精卵の普及に対する課題の1つは、受胎率である。最近5年間の体外受精卵の移植頭数と受胎率の推移を、表4に示した。単純に受胎率を算出した場合、ここ数年間の受胎率は徐々に増加しており、昨年度は41.6%であった。しかし、移植地域ごとに細かく状況を調べると、受胎率は0~70%と格差が大きく、同一地域内でも農家ごとの格差は大きい。受胎率の向上は、体外受精卵に関わらず、受精卵移植を推進する上で解決しなければならない問題点でもある。

表4 体外受精卵の受胎率の推移

年度	移植頭数	受胎頭数 (受胎率 %)
11	5,945	2,241 (37.6%)
12	7,679	2,880 (37.5%)
13	6,616	2,345 (36.8%)
14	5,713	2,295 (40.2%)
15	4,363	1,816 (41.6%)

4 開発技術の学術的評価

本グループの研究は、受精卵を培養しながら輸送するという観点から開発した器具と、これまで受精卵の培養に全く利用されなかった抗酸化物質であるメルカプトエタノールの利用に着目した点に大きな意義がある。これらの研究成果は、特許申請をしているとともに、国内外の学術誌、学会に公表されており、学術的にも高い評価を得ている。

5 開発技術の産業への貢献

1) 和牛肥育モト牛の市場販売

生まれた子牛を換金することは畜産経営の上で大切なことであり、短時間でそれが可能となるのは家畜市場で販売する方法である。

体外受精卵産子の取り引きは、平成10年ごろから全国各地の家畜市場で活発化している。その特徴は、約2ヵ月齢のスモールとして販売される事例が圧倒的に多いことであり、主な移植先である酪農家が長期間育成をせずに販売できる点にある。最近、多頭数の受卵牛の発情を同期化し、新鮮卵を利用した集約的な移植が行われる地区が増えており、家畜市場での販売頭数の増加につながることが期待されている。

ここ数年、体外受精卵産子は交雑種と比較して雄雌共に10万円以上の高値で安定した販売が継続されており、移植を行った農家経営の安定に寄与している。

2) 乳肉複合経営に見る体外受精卵の活用

乳肉複合経営では、受精卵移植を利用して肉牛の生産性を向上させ、経営の安定を図る

目的で、体外受精卵の移植が継続的に行われている。

最近、1戸当たりの飼養頭数が増え、大規模な経営が展開されている例が増加している一方で繁殖成績の低下が指摘されている。受精卵移植でも同様の傾向が見られるため、受胎率を高めるための飼養管理指導や、受卵牛の選定を見直すとともに、新鮮卵を定期的に移植することなどを試みている。

肥育終了後の交雑種と黒毛和種体外受精卵産子の肥育成績を比較すると、粗利益の段階で10万円以上の価格差が算定されており、乳肉複合経営の経済効果として体外受精卵の利用は有効と判断されている。

3) 繁殖モト牛生産にみる体外受精技術の活用

血統的には優秀であるものの、高齢や事故等で繁殖が困難になった雌牛からの子牛生産を、体外受精技術が可能とした。また、体外受精技術を育種改良へ利用する試みも実施されており、一定の事務手続きを終えた上で受託生産を行っている。

しかし、受精卵移植は乳牛飼養農家では一般的な技術として普及している半面、肉牛生産地帯では移植経験が乏しいのが実情である。そこで、それら地域での子牛生産を1番の目標に掲げ、凍結卵とともに新鮮卵も活用した移植を行い、優れた遺伝資源の有効活用に貢献している。

4) 体外受精卵産子の産肉成績

各地で肥育された体外受精卵産子は、(財)興農会が主催する枝肉共励会(年2回)や研究会(年1回)で枝肉成績が蓄積されている。1回の共励会にはおよそ50頭、研究会には30頭の体外受精卵産子が出品されている。その成績は表5に示した通り、平成11年以降これまでに去勢296頭、雌161頭の合計457頭が出品され、肉質等級で4以上に格付けされたのは71.8%の328頭と優れた成績であることが判明しており、食肉処理場で材料を採取して生産した体外受精卵が、再び食肉処理場に肥育されて戻るといふ、肉用牛の循環システムが確立された。

表5 体外受精卵産子枝肉共励会・研究会成績(枝肉等級頭数分布)

性	頭数	A5	A4	A3	A2	B5	B4	B3	4以上 (頭数割合)
去勢	296	115	101	57	8	0	1	5	317
雌	161	42	59	33	10	3	7	2	11
合計	457	157	160	90	18	3	8	7	328 (71.8%)

5) 性判別体外受精卵の活用

産業動物である家畜の性を支配する考え方は古くからあり、乳牛では雌を、肉牛では雄子牛の生産が経営にとっては有効である。

そこで、生産した体外受精卵の細胞の一部を切り取り、DNAの増幅と検査をLAMP法で雌雄判別をした体外受精卵を供給している。性判別した受精卵の凍結保存技術にはまだ課題が残る状況にあるため、現在は全ての性判別体外受精卵で新鮮卵移植を実施している。

6 今後の展望

昨今、諸外国でのBSEの発生に伴う牛肉の輸入停止措置により、わが国の食品産業へ多大な影響が出ていることは報道のとおりである。

食の安心・安全が強く求められる時代背景のもと、国産牛肉の生産に当たり優れた肉用牛である黒毛和種の増産を図ることは重要な課題であると考えられる。その中で、未利用であった卵子を材料として生産した体外受精卵を有効に活用し、良質な牛肉生産の一翼を担い貢献したいと考えている。さらに、受精卵の性判別技術を加えることによる肉用ならびに乳用子牛の生産は、わが国畜産業への高い貢献がなされるものと確信している。